



MINISTERIO
DE INDUSTRIA, TURISMO
Y COMERCIO



Oficina Española
de Patentes y Marcas

REC'D 08 JUN 2004

WIPO PCT

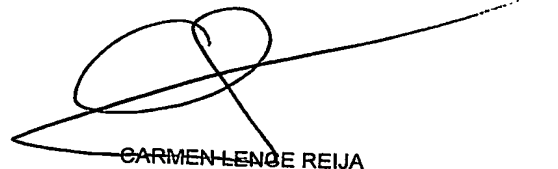
CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE de INVENCION número 200300708, que tiene fecha de presentación en este Organismo el 26 de Marzo de 2003.

Madrid, 7 de Mayo de 2004

El Director del Departamento de Patentes
e Información Tecnológica.

P.D.


CARMEN LENCE REIJA

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGIA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

INSTANCIA DE SOLICITUD

NUMERO DE SOLICITUD

P200300708

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Dpto. SECRETARÍA GENERAL
REPOSICIÓN
Panamá 1 - Madrid 2281 11:53
FECHA Y HORA DE PRESENTACIÓN EN LA O.E.P.M.

(1) MODALIDAD

☒ PATENTE DE INVENCION

☐ MODELO DE UTILIDAD

(2) TIPO DE SOLICITUD

- ☐ ADICIÓN A LA PATENTE
☐ SOLICITUD DIVISIONAL
☐ CAMBIO DE MODALIDAD
☐ TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE EUROPEA
☐ PCT: ENTRADA FASE NACIONAL

(3) EXPED. PRINCIPAL O DE ORIGEN:
MODALIDAD

NUMERO SOLICITUD

FECHA SOLICITUD

FECHA Y HORA PRESENTACIÓN EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(4) LUGAR DE PRESENTACIÓN

MADRID

CÓDIGO

28

(5) SOLICITANTE(S): APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL

MEDPLANT GENETICS, S.L.

NOMBRE

NACIONALIDAD

ESPAÑOLA

CÓDIGO PAIS

ES

DNI/CIF

B95091799

CNAE

PYME

(6) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE

DOMICILIO C/ Sangroniz, 6

LOCALIDAD SONDICA

PROVINCIA VIZCAYA

PAIS RESIDENCIA ESPAÑA

NACIONALIDAD ESPAÑOLA

TELEFONO

FAX

CORREO ELECTRONICO

CÓDIGO POSTAL 48150

CÓDIGO PAIS ES

CÓDIGO NACION ES

(7) INVENTOR (ES):

APELLIDOS

NOMBRE

NACIONALIDAD

CÓDIGO PAIS

SAENZ JIMÉNEZ

MARÍA PILAR

ESPAÑOLA

ES

MOLINA VILA

MIGUEL

ESPAÑOLA

ES

JUNQUERA SÁNCHEZ-VALLEJO

CORINA

ESPAÑOLA

ES

(8)

☐ EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR

☒ EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O ÚNICO INVENTOR

(9) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:

☒ INVENC. LABORAL

☐ CONTRATO

☐ SUCESIÓN

(9) TÍTULO DE LA INVENCION

MÉTODO IN VITRO PARA LA DETECCIÓN DE CARCINOMAS

(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:

☐ SI

☒ NO

(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:
PAIS DE ORIGEN

CÓDIGO PAIS

NÚMERO

FECHA

FECHA

(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/86 DE PATENTES

(15) AGENTE/REPRESENTANTE: NOMBRE Y DIRECCIÓN POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.I., NOMBRE Y CÓDIGO) (RELLENSE, ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES)
CARPINTERO LOPEZ, FRANCISCO, 403/0, ALCALA, 35, MADRID, MADRID, 28014, ESPAÑA

(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:

☒ DESCRIPCIÓN. N° DE PÁGINAS: 29

☒ N° DE REIVINDICACIONES: 4

☒ DIBUJOS N° DE PÁGINAS: 3

☐ LISTA DE SECUENCIAS N° DE PÁGINAS: 0

☒ RESUMEN

☐ DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☐ TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☒ DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN

☒ JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASAS DE SOLICITUD

☒ HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

☐ PRUEBAS DE LOS DIBUJOS

☐ CUESTIONARIO DE PROSPECCIÓN

☒ OTROS: DISKETTE CON MEMORIA

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE

FRANCISCO CARPINTERO LOPEZ

Colgado N° 252

(VER COMUNICACIÓN)

FIRMA DEL FUNCIONARIO

NOTIFICACIÓN DE PAGO DE LA TASA DE CONCESIÓN:

Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 2245/1986

ILMO. SR. DIRECTOR DE LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

informacion@oeppm.es
www.oeppm.es

C/ PANAMÁ, 1 • 28071 MADRID

NO CUMPLIMENTAR LOS CUADROS ENMARCADOS EN ROJO

HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍAOficina Española
de Patentes y Marcas

NUMERO DE SOLICITUD

P200300708

FECHA DE PRESENTACION

☒ PATENTE DE INVENCION☐ MODELO DE UTILIDAD

(5) SOLICITANTES:

APELLIDOS O
DENOMINACIÓN SOCIAL

NOMBRE

NACIONALIDAD

CÓDIGO
PAÍS

DNI/CIF

CNAE

PYME

(7) INVENTORES:

APELLIDOS

NOMBRE

NACIONALIDAD

MARTÍNEZ MARTÍNEZ
SIMÓN BUELA
GÓMEZ ROMÁNANTONIO
LAUREANO
JOSÉ JAVIER

ES

(12) EXPOSICIONES OFICIALES:

LUGAR

FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:

PAIS DE ORIGEN

CÓDIGO
PAÍS

NÚMERO

FECHA

NO CUMPLIMENTAR LOS RECUADROS ENMARCADOS EN ROJO



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

NÚMERO DE SOLICITUD

P20 0500 708

FECHA DE PRESENTACIÓN

03 MAR 26 11:54

RESUMEN Y GRÁFICO

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

MÉTODO IN VITRO PARA LA DETECCIÓN DE CARCINOMAS

La presente invención se refiere método in vitro para detectar la presencia de un carcinoma transicional de vejiga en un individuo, para determinar el estadio o la severidad de dicho carcinoma en el individuo, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dicho carcinoma, que comprende: a) la detección y/o cuantificación de la proteína FGFR3, del mRNA del gen FGFR3 o el correspondiente cDNA en una muestra de dicho individuo, y b) la comparación de la cantidad de proteína FGFR3, de la cantidad de mRNA del gen FGFR3 o de la cantidad del correspondiente cDNA detectada en una muestra de un individuo, con la cantidad de proteína FGFR3, con la cantidad del mRNA del gen FGFR3 o con la cantidad del correspondiente cDNA detectada en las muestras de individuos control o en muestras anteriores del mismo individuo o con los valores normales de referencia; así como a la búsqueda, identificación, desarrollo y evaluación de la eficacia de compuestos para terapia de dicho carcinoma transicional de vejiga con el fin de desarrollar nuevos medicamentos; así como a agentes que inhiben la expresión y/o actividad de la proteína FGFR3.

GRÁFICO

(VER INFORMACIÓN)



12

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

21

NUMERO DE SOLICITUD

200500708

22

FECHA DE PRESENTACIÓN

26/03/2003

62

PATENTE DE LA QUE ES
DIVISORIA

31 NUMERO

DATOS DE PRIORIDAD

32 FECHA

33 PAÍS

71 SOLICITANTE (S)

MEDPLANT GENETICS, S.L.,

DOMICLIO C/ Sangroniz, 6
SONDICA

NACIONALIDAD ESPAÑOLA
48150 VIZCAYA ESPAÑA

72 INVENTOR (ES)

MARÍA PILAR SAENZ JIMÉNEZ, MIGUEL MOLINA VILA, CORINA JUNQUERA
SÁNCHEZ-VALLEJO, ANTONIO MARTÍNEZ MARTÍNEZ, LAUREANO SIMÓN BUELA, JOSÉ JAVIER

51 Int. Cl.

GRÁFICO (SÓLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)

54 TÍTULO DE LA INVENCION

MÉTODO IN VITRO PARA LA DETECCIÓN DE CARCINOMAS

57 RESUMEN

MÉTODO IN VITRO PARA LA DETECCION DE CARCINOMAS

La presente invención se refiere método in vitro para detectar la presencia de un carcinoma transicional de vejiga en un individuo, para determinar el estadio o la severidad de dicho carcinoma en el individuo, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dicho carcinoma, que comprende: a) la detección y/o cuantificación de la proteína FGFR3, del mRNA del gen FGFR3 o el correspondiente cDNA en una muestra de dicho individuo, y b) la comparación de la cantidad de proteína FGFR3, de la cantidad de mRNA del gen FGFR3 o de la cantidad del correspondiente cDNA detectada en una muestra de un individuo, con la cantidad de proteína FGFR3, con la cantidad del mRNA del gen FGFR3 o con la cantidad del correspondiente cDNA detectada en las muestras de individuos control o en muestras anteriores del mismo individuo o con los valores normales de referencia; así como a la búsqueda, identificación, desarrollo y evaluación de la eficacia de compuestos para terapia de dicho carcinoma transicional de vejiga con el fin de desarrollar nuevos medicamentos; así como a agentes que inhiben la expresión y/o actividad de la proteína FGFR3.

MÉTODO IN VITRO PARA LA DETECCIÓN DE CARCINOMAS.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para detectar la presencia de un carcinoma transicional de vejiga en un individuo, para determinar el estadio o la severidad de dicho carcinoma en el individuo, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dicho carcinoma; a la búsqueda, identificación, desarrollo y evaluación de la eficacia de compuestos para terapia de dicho carcinoma transicional de vejiga con el fin de desarrollar nuevos medicamentos; así como a agentes que inhiben la expresión y/o actividad de la proteína FGFR3.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

A pesar de todos los avances que se han producido en los últimos 20 años, el cáncer es todavía una de las principales causas de muerte en todo el mundo. El carcinoma transicional de vejiga es el cáncer más común del tracto urinario; es también el cuarto tipo de cáncer más común en hombres y el octavo en mujeres. Según datos de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, GLOBOCAN, del año 2000, cada año se diagnostican más de 136.000 nuevos casos en Europa, 13.000 en Japón y 56.000 en América del Norte; un número de pacientes 3-4 veces mayor son tratados y monitorizados en hospitales cada año; y más de 49.000, 4.500 y 12.000 muertes son causadas por el carcinoma transicional de vejiga cada año en Europa, Japón y América del Norte, respectivamente.

El carcinoma transicional de vejiga es el tipo más común de cáncer de vejiga; comprende más del 90% de todos los casos. Los casos restantes son carcinomas de células escamosas (7%), adenocarcinomas (2%), y carcinomas indiferenciados (1%).

El grado y el estadio clínico-patológico del tumor son los mejores indicadores de pronóstico de carcinoma transicional de vejiga. Los carcinomas de vejiga se gradúan citomorfológicamente desde G1 hasta G3 según la OMS (Organización Mundial de la Salud), por estado decreciente de diferenciación celular y creciente de agresividad de la enfermedad. Respecto al estadio, o invasividad, los TCCs de vejiga se clasifican en superficial con y sin afectación de la lámina propia (Ta y T1),

infiltrante de capas profundas (T2 a T4) y el poco común Carcinoma in situ o tumor in situ (TIS). Los tumores de bajo grado (G1) están normalmente confinados a la mucosa o infiltran capas superficiales (estadio Ta y T1). La mayoría de los tumores de grado alto se detectan al menos en estadio T1 (invadiendo la lámina propia). Aproximadamente el 75% de los casos diagnosticados de carcinoma transicional de vejiga son superficiales. El 25% restante son invasivos de músculo en el momento de diagnóstico. La importancia de separar clínicamente los tumores infiltrantes de los superficiales, viene dada por la necesidad de realizar una cistectomía radical con linfadenectomía y reconstrucción vesical en los casos que muestran infiltración más allá de la capa muscular. Los tumores que se diagnostican en estadios Ta y T1 permiten una preservación del órgano y son tratados mediante resección transuretral y en ocasiones quimioterapia o inmunoterapia intravesical.

El pronóstico de los pacientes afectados de carcinoma transicional de vejiga superficial es bueno, pero tienen un riesgo de recidiva locoregional del 70%; estos pacientes tienen que ser monitorizados para recidiva tras el tratamiento con protocolos variables según los hospitales, aunque el más común es evaluación por el urólogo cada 3 meses durante los 2 primeros años, cada 6 meses durante los 2 años siguientes y posteriormente cada año. A pesar del alto riesgo de recidiva, los tumores Ta tienden a ser de bajo grado y sólo el 10-15% progresa a invasivo de músculo tras 2 años; el porcentaje de tumores T1 que progresa a estadio T2 es mayor (30-50%). El pronóstico de los pacientes afectados de carcinoma transicional de vejiga invasivo es malo; el 50% de estos pacientes en estadio T2 o mayor, desarrolla metástasis distantes durante los 2 años posteriores al diagnóstico, y el 69% muere en 5 años. Nuevos sistemas de diagnóstico precoz son necesarios dado que el 80-90% de los pacientes en estadio T2 o mayor, son diagnosticados *de novo* en ese estadio de gran agresividad y no en estadios previos (de Vere White, R.W. and Stapp, E., *Oncology*, 1998, 12:1717-1723).

A día de hoy, el mejor sistema de diagnóstico del carcinoma transicional de vejiga en pacientes que presentan síntomas como hematuria o disuria, en ausencia de infección, es la cistoscopia. Se ha calculado, en base a datos estadísticos de incidencia y recidiva, que en Estados Unidos se realizan más de 500.000 cistoscopias al año (van Rhijn, B.W.G., et al., *Cancer Res.*, 2001, 61:1265-1268). Se utilizan cistoscopios flexibles para hacer la técnica menos agresiva, pero ésta sigue siendo invasiva, y requiere alguna forma de anestesia. La técnica no invasiva de elección

para el diagnóstico de carcinoma transicional de vejiga, consiste en la identificación de células neoplásicas, a través del examen morfológico de las células en muestras de orina (Loh, C.S., et al., Br. J. Urol., 1996, 77:655-658). Actualmente, la citología se utiliza en el seguimiento de los pacientes diagnosticados y tratados de carcinomas vesicales. Por otro lado, la citología de orina es capaz de detectar neoplasias *in situ* sin manifestación macroscópica y los carcinomas de tracto urinario superior, es decir, uréter y pelvis renal, inaccesibles para cualquier proceso endoscópico (Lotan, Y. and Roehrborn, J. Urol., 2002, 167:75-79). Sin embargo, numerosos estudios han demostrado que la citología tiene una sensibilidad muy baja, y no identifica el 50% de los tumores (Boman, H., et al., J. Urol., 2002, 167:80-83); en la actualidad no hay ningún método no invasivo disponible para detectar el carcinoma transicional de vejiga con alta sensibilidad y especificidad (Boman, H., et al., J. Urol., 2002, 167:80-83). Estos métodos no invasivos permitirían procedimientos rutinarios de análisis, como la detección precoz de cualquier tipo de carcinoma transicional, incluido el tracto urinario superior, bien sea *de novo* o en evaluación de recidivas tras tratamiento, e incluso, podrían identificar los tumores infiltrantes de inicio o aquellos con un mayor riesgo de desarrollar enfermedad agresiva.

La alteración de los niveles de expresión génica está íntimamente asociada al crecimiento celular descontrolado y a la dediferenciación, hechos comunes a todos los tipos de cáncer. Los niveles de expresión de los llamados *genes supresores de tumores*, que actúan impidiendo el crecimiento celular maligno, están reprimidos en las células tumorales; y los niveles de expresión de los llamados *oncogenes*, que actúan induciendo el crecimiento maligno, están incrementados en las células tumorales. Se ha asociado muchos de estos genes al desarrollo del carcinoma transicional de vejiga, entre ellos Rb, p53, p16, p14ARF, cyclin D1 (Fujimoto, K., et al., Cancer Res., 1998, 52:1393-1398; Grossman, B.H., et al., Clin. Cancer Res., 1998, 8:829-834; Balazs, M., et al., Genes Chromosomes Cancer, 1997, 19:84-89). La alteración en la expresión de dichos genes puede ser utilizada como un marcador de diagnóstico de carcinoma transicional de vejiga; entre estos potenciales marcadores, se han propuesto la Proteína de Matriz Nuclear NMP22 (Soloway, M.S., et al., J. Urol., 1996, 156:363-367; Casella, R., et al., J. Urol, 2000, 164:1926-1928), Ácido hialurónico y Hialuronidasa (Pham, H.T., et al., Cancer Res., 1997, 57:778-783; Hautmann, S.H., et al., J. Urol., 2001, 165:2068-2074), Complejos de membrana basal (BTA) (Pode, D., et al., J. Urol., 1999, 161:443-446; Thomas, L., et al., Clin.

Chem, 1999, 45:472-477), Antígeno carcinoembrionario (CEA) (Halim, A.B., et al., Int. J. Biol. Markers, 1992; 7:234-239), Uroplaquina II (Wu, X.R., et al., Cancer Res., 1998; 58:1291-1297), Factor Sérico de Crecimiento de Hepatocitos (SF/HGF) (Gohji, K., et al., J. Clin. Oncol., 2000; 18:2963-2971), Proteína de tumor de mama de 8 Kda (MAT-8) (Morrison, B.W., et al., J. Biol. Chem., 1995, 270:2176-2182), Telomerasa (Neves, M., et al., J. Urol., 2002, 167:1276-1281), Proteínas de la familia de las Queratinas / Citoqueratinas, como la Citoqueratina 20 (Buchumensky, V., et al., J. Urol., 1998, 160:1971-1974), Citoqueratina 18 (Sánchez-Carbayo, M., et al., Clin. Cancer Res., 2000, 6:3585-3594). Sin embargo, no hay ningún marcador para diagnosticar precozmente el carcinoma transicional de vejiga, que se haya demostrado útil en ensayos clínicos (Miyake, H., et al., J. Urol., 2002; 167:1282-1287). Muchos de los genes implicados en el inicio y la progresión del carcinoma transicional de vejiga son todavía desconocidos; la identificación de genes expresados diferencialmente en el carcinoma transicional de vejiga, podría conducir a la identificación de marcadores biológicos, que podrían tener un gran valor para el diagnóstico, el pronóstico y el tratamiento de esta enfermedad.

Una vez que el carcinoma transicional de vejiga ha sido diagnosticado, se lleva a cabo una resección transuretral para tratar los tumores papilares superficiales; los TIS y T1, además de aplicar resección, son tratados con el Bacilo Calmette Guerin (BCG) en forma de instilaciones intravesicales. Si el cáncer es invasivo muscular, al paciente se le realiza una cistectomía radical; si el paciente no tolera esta cirugía, se utiliza radioterapia o quimioterapia.

El 69% de los pacientes afectados de carcinoma transicional de vejiga invasivo muscular, mueren durante los 5 años posteriores al diagnóstico, incluso habiendo recibido tratamiento. Son necesarias aproximaciones terapéuticas alternativas para tratar el carcinoma transicional de vejiga invasivo muscular con una mayor eficiencia; también son necesarias aproximaciones terapéuticas alternativas para tratar tumores superficiales de una forma más eficiente que la cirugía, o para complementarla, con el fin de evitar la recidiva y la progresión de tumores a estadios invasivos.

Los factores de Crecimiento de Fibroblastos (FGF) son una familia de más de 90 proteínas, implicadas en la regulación de procesos biológicos, incluyendo proliferación celular, diferenciación celular, crecimiento celular, migración celular, morfogénesis, angiogénesis y remodelación tisular. Los FGFs se unen con alta

afinidad a receptores situados en la superficie celular (Receptores de FGFs o FGFRs), que tienen actividad tirosín-quinasa. Las quinasas son una familia de proteínas que fosforilan otras proteínas y tienen un papel clave en la regulación de muchos procesos celulares (Hanks S.K., et al., Science, 1988, 241:42-52). Cuando el

5 ligando FGF se une al FGFR, el FGFR se convierte en una forma dimérica activa que se autofosforila en el dominio quinasa; entonces, el FGFR activado se une y fosforila otras proteínas efectoras, comenzando así una cascada de transducción de señales desde la superficie celular al núcleo (Crews, C.M., and Erikson, R.L., Cell, 1993, 74:215-217). La pérdida de regulación de la cascada de señalización de factores de

10 crecimiento es un hecho frecuente en procesos tumorales.

Cuatro FGFRs han sido identificados hasta el momento: FGFR1, también llamado Flg, fms-like gene, flt2, bFGFR, N- bFGFR o Cek1; FGFR2, también llamado Bek, bacterial-expressed kinase, KGFR, Ksam, Ksaml o Cek3; FGFR3, también

15 llamado Cek2; y FGFR4. Todos los FGFRs maduros comparten una estructura común, que consiste en un péptido señal amino terminal, 3 dominios extracelulares *immunoglobulin-like* (dominio Ig I, dominio Ig II, dominio Ig III), con una region ácida entre los dominios Ig I e Ig II (el dominio *acidic box*), un dominio transmembrana, y dominios quinasa intracelulares (Ullrich, A., and Schlessinger, J., Cell, 1990, 61:203-212; Jonson, D.E., and Williams, L.T., Adv. Cancer Res, 1992, 60:1-41). Las distintas

20 isoformas de los FGFRs tienen diferentes afinidades por los distintos ligandos; así, FGF8 y FGF9 son los que presentan una mayor afinidad por FGFR3 (Chellaiah, A., et al., J. Biol. Chem., 1999, 274:34785-34794).

Se han asociado mutaciones puntuales específicas en *FGFR3* que conducen a la activación de su actividad tirosín-quinasa y a diferentes síndromes relacionados

25 con el desarrollo óseo (Chen, H., et al. J. Clin. Invest., 1999, 104(11):1517-1525). También se han detectado mutaciones en *FGFR3* en mielomas múltiples (10-25% de los tumores. Plowright, E.E., et al., Blood, 2000, 95:992-998; Chesi, M., et al., Blood, 2001; 97:729-736; Soverini, S., et al., Haematologica, 2002, 87:1036-1040; Pollett, J.B., et al., Blood, 2002, 100:3819-3821), en carcinomas cervicales (3,5-25% de los

30 tumores. Sibley, K., et al., Oncogene, 2001, 20:4416-4418; Dai, H., et al., Anal. Cell. Pathol., 2001, 23:45-49) y en carcinoma transicional de vejiga (Cappellen, D., et al., Nat. Genet., 1999, 23:18-20; Sibley, K., et al., Oncogene, 2001, 20:686-691; Sibley, K., et al., Oncogene, 2001, 20:4416-4418; Billerey, C., et al., Am. J. Pathol., 2001, 158:1955-1959). Se detectaron mutaciones activadoras de la función de *FGFR3* en

40-50% de los carcinomas transicionales de vejiga; la incidencia era significativamente mayor, 80%, en tumores superficiales, que en tumores invasivos; y los porcentajes de recidiva eran significativamente menores en tumores que presentaban una mutación en FGFR3 (Kimura, T., et al., Cancer, 2001, 92:2555-2561; van Rhijn, B.W.G., et al., Cancer Res., 2001, 61:1265-1268).

Tras laboriosa investigación, los inventores de la presente invención han descubierto que la expresión del gen *FGFR3* y la concentración de la proteína FGFR3 se ven incrementados en biopsias de carcinomas transicionales de vejiga; y además, que el tratamiento de células de vejiga tumorales que expresan elevados niveles de FGFR3, con un anticuerpo específico contra la proteína FGFR3, produce la inhibición de la proliferación celular de líneas celulares tumorales de vejiga.

La presente invención proporciona por tanto un método *in vitro* de alta sensibilidad para detectar la presencia de un carcinoma transicional de vejiga en un individuo, para determinar el estadio o la severidad de dicho carcinoma en el individuo, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dicho carcinoma. Asimismo, la presente invención proporciona dianas o herramientas para la búsqueda, identificación, desarrollo y evaluación de la eficacia de compuestos para terapia del carcinoma transicional de vejiga, particularmente para el tratamiento de los tumores, como neoadyuvante, antes de la resección, o como adyuvante, después de la resección, con el fin de disminuir las posibilidades de recidiva y progresión. Finalmente, la invención proporciona agentes caracterizados porque inhiben la expresión y/o la actividad de la proteína FGFR3 para el tratamiento del carcinoma transicional de vejiga.

OBJETO DE LA INVENCION

La presente invención tiene como objeto principal el desarrollo de un método *in vitro* para detectar la presencia de un carcinoma transicional de vejiga en un individuo, para determinar el estadio o la severidad de dicho carcinoma en el individuo, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dicho carcinoma.

Otro objeto de la presente invención es un método *in vitro* para buscar, identificar, desarrollar y evaluar la eficacia de compuestos para la terapia del carcinoma transicional de vejiga.

Un objeto adicional de la invención reside en el uso de secuencias derivadas del gen *FGFR3* para el diagnóstico y pronóstico *in vitro* del carcinoma transicional de vejiga así como para la búsqueda, identificación, desarrollo y evaluación de la eficacia de compuestos para la terapia de dicho carcinoma.

Otro objeto de la presente invención consiste en proporcionar agentes caracterizados porque inhiben la expresión y/o la actividad de la proteína FGFR3, para el tratamiento del carcinoma transicional de vejiga.

Por último, es también objeto de la invención una composición farmacéutica que comprenda uno o varios agentes terapéuticos junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable, para el tratamiento del carcinoma transicional de vejiga.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra los resultados del análisis, por transferencia de Western, de la expresión de la proteína FGFR3 en muestras de vejiga humana. Se analizaron tres muestras de vejiga normal (muestras número 46, 55 y 63), seis muestras de carcinoma transicional de vejiga de bajo grado, superficial (G1, Ta) (muestras número 48, 49, 50, 53, 56 y 59), tres muestras de carcinoma transicional de vejiga de alto grado con invasión de la lámina propia (G3, T1) (muestras número 57, 61 y 67), cuatro muestras de alto grado con invasión del músculo detrusor (G3, T2) (muestras número 47, 51, 58 y 60) y dos muestras de grado desconocido (muestras número 54 y 62). La cantidad de extracto total de proteína cargado fue 20 µg en todos los casos. Las membranas se revelaron con anticuerpo anti-FGFR3 (A) y con anti-actina como control de carga (B). El receptor aparecía en forma de varias bandas inmunorreactivas de distinto peso molecular: 135 kDa, que corresponde al receptor totalmente glucosilado; 85 kDa, que corresponde a la forma intracelular no glucosilada, y bandas de masa molecular intermedia (100-110 kDa), que corresponden a distintos grados de glucosilación de FGFR3. Además, se detectaban bandas inmunorreactivas de peso molecular menor (50 kDa), procedentes probablemente de su degradación proteolítica.

La Figura 2 muestra los resultados del análisis, por transferencia de Western, de la expresión de la proteína FGFR3 en la línea celulares de carcinoma transicional de vejiga humano RT-112. Se añadió como control negativo una muestra de vejiga humana normal (muestra número 46), y como control positivo una muestra de tumor de vejiga (muestra número 53). La cantidad de proteína cargada fue 20 µg en todos los casos.

La Figura 3 representa los efectos de los anticuerpos anti-FGFR3 (barras azules) y anti-β2 microglobulina (barras rojas) sobre el crecimiento de las células de carcinoma transicional de vejiga RT-112 en medio libre de suero. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos y se trataron con los anticuerpos durante 24 o 48 h. El crecimiento se expresa en relación a los controles (sin anticuerpo). Los puntos son la media de 6 réplicas, las líneas verticales representan la desviación estándar.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Para facilitar la comprensión de la presente solicitud de patente, exponemos a continuación el significado de algunos términos y expresiones en el contexto de la invención:

Los términos "sujeto" o "individuo" se refieren a miembros de especies de animales mamíferos, e incluye, pero no se limita, a animales domésticos, primates y humanos; el sujeto es preferiblemente un ser humano, masculino o femenino, de cualquier edad o raza.

El término "cáncer" se refiere a la enfermedad que se caracteriza por una proliferación descontrolada de células anormales capaces de invadir tejidos adyacentes y diseminarse a órganos lejanos.

El término "carcinoma transicional de vejiga" se refiere a cualquier desorden proliferativo maligno de células del epitelio transicional de vejiga.

El término "tumor" se refiere a cualquier masa anormal de tejido producto de un proceso neoplásico, benigno (no canceroso) o maligno (canceroso).

El término "gen" se refiere a una cadena molecular de desoxirribonucleótidos, que codifica una proteína.

El término "DNA" se refiere al ácido desoxirribonucleico. Una secuencia de DNA es una secuencia de desoxirribonucleótidos.

El término "cDNA" se refiere a una secuencia de nucleótidos, complementaria de una secuencia de mRNA.

5 El término "RNA" se refiere al ácido ribonucleico. Una secuencia de RNA es una secuencia de ribonucleótidos.

El término "mRNA" se refiere al ácido ribonucleico mensajero, que es la fracción del RNA total que se traduce a proteínas.

10 La frase "mRNA transcrito de" se refiere a la transcripción del gen (DNA) en mRNA, como primer paso para que el gen se exprese y traduzca a proteína.

El término "secuencia de nucleótidos" o "secuencia nucleotídica" se refiere indistintamente a una secuencia de ribonucleótidos (RNA) o de desoxirribonucleótidos (DNA).

15 El término "proteína" se refiere a una cadena molecular de aminoácidos, con una actividad biológica.

Los términos "péptido" y "polipéptido" se refieren a un fragmento proteico. Los términos "proteína" y "péptido", se usan indistintamente.

20 La frase "niveles elevados" significa que los niveles medidos en pacientes de Carcinoma transicional de vejiga son superiores a los niveles medidos en una población control de sujetos sin historial de Carcinoma transicional de vejiga.

El término "sensibilidad" se refiere a la detección de falsos negativos (diagnóstico negativo de Carcinoma transicional de vejiga, cuando el paciente está afectado de Carcinoma transicional de vejiga); una sensibilidad del 100% significa que no hay falsos negativos.

25 El término "especificidad" se refiere a la detección de falsos positivos (diagnóstico positivo de Carcinoma transicional de vejiga, cuando el paciente no está afectado de Carcinoma transicional de vejiga); una especificidad del 100% significa que no hay falsos positivos.

30 El término "anticuerpo" se refiere a una glucoproteína que exhibe una actividad de unión específica por una proteína particular, a la que se denomina "antígeno". El término "anticuerpo" comprende anticuerpos monoclonales, o anticuerpos policlonales, intactos, o fragmentos de ellos; e incluye anticuerpos humanos, humanizados y de origen no humano. Los "anticuerpos monoclonales" son poblaciones homogéneas de anticuerpos, altamente específicos, que están dirigidas

contra un único sitio o "determinante" antigénico. Los "anticuerpos policlonales" incluyen poblaciones heterogéneas de anticuerpos, que están dirigidos contra diferentes determinantes antigénicos.

5 El término "epítipo", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a un determinante antigénico de una proteína, que es la secuencia de aminoácidos de la proteína que un anticuerpo específico reconoce.

10 El término "fase sólida", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a una matriz no acuosa a la que se puede unir el anticuerpo. Ejemplos de materiales para fase sólida incluyen vidrio, polisacáridos, por ejemplo agarosa, poliacrilamida, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. Ejemplos de formas de fase sólida son el pocillo de una placa de ensayo o una columna de purificación.

15 El término "oligonucleótido cebador", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a una secuencia nucleotídica, que es complementaria de una secuencia nucleotídica del gen FGFR3. Cada cebador hibrida con su secuencia nucleotídica diana y actúa como un sitio de inicio para la polimerización del DNA.

20 El término "sonda", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a una secuencia nucleotídica complementaria de una secuencia nucleotídica derivada del gen FGFR3, que se puede utilizar para detectar esa secuencia nucleotídica derivada del gen FGFR3.

25 El término "diana terapéutica" se refiere a secuencias nucleotídicas o peptídicas, contra las que se puede diseñar y aplicar clínicamente un fármaco o compuesto terapéutico.

30 El término "agonista" se refiere a cualquier molécula que mimetice la actividad biológica de la molécula agonizada. Ejemplos de moléculas agonistas incluyen, entre otros, proteínas, péptidos, variaciones de secuencia de péptidos naturales y pequeñas moléculas orgánicas (de peso molecular inferior a 500 daltons).

La presente invención se basa en el descubrimiento de que tanto la expresión génica de *FGFR3*, como la concentración de la proteína FGFR3 se ven incrementadas en el carcinoma transicional de vejiga, y en que la proliferación de líneas celulares tumorales de vejiga se inhibe al tratarlas con un anticuerpo específico contra la proteína FGFR3.

En este sentido, la presente invención proporciona, en primer lugar, un método *in vitro* para detectar la presencia de un carcinoma transicional de vejiga en un individuo, para determinar el estadio o la severidad de dicho carcinoma en el individuo, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dicho carcinoma, que comprende:

a) la detección y/o cuantificación de la proteína FGFR3, del mRNA del gen *FGFR3* o el correspondiente cDNA en una muestra de dicho individuo, y

b) la comparación de la cantidad de proteína FGFR3, de la cantidad de mRNA del gen *FGFR3* o de la cantidad del correspondiente cDNA detectada en una muestra de un individuo, con la cantidad de proteína FGFR3, con la cantidad del mRNA del gen *FGFR3* o con la cantidad del correspondiente cDNA detectada en las muestras de individuos control o en muestras anteriores del mismo individuo o con los valores normales de referencia.

El método proporcionado por la presente invención es de alta sensibilidad y especificidad, y se basa en que sujetos o individuos diagnosticados de carcinoma transicional de vejiga, presentan niveles elevados de mRNA transcrito del gen *FGFR3* (*niveles elevados de expresión del gen FGFR3*), o concentraciones elevadas de la proteína codificada por el gen *FGFR3* (*proteína FGFR3*), en comparación con los correspondientes niveles en muestras procedentes de sujetos sin historial clínico de carcinoma transicional de vejiga.

El presente método comprende una etapa de obtención de la muestra del individuo. Se puede trabajar con distintas muestras fluidas como, por ejemplo: orina, sangre, plasma, suero, líquido pleural, líquido ascítico, líquido sinovial, bilis, semen o líquido cefalorraquídeo. La muestra también puede ser tejido de vejiga, que se puede obtener por cualquier método convencional, preferiblemente mediante cistoscopia.

Las muestras pueden ser obtenidas de sujetos previamente diagnosticados, o no diagnosticados, de carcinoma transicional de vejiga; o también de un sujeto en tratamiento, o que ha sido tratado previamente contra el carcinoma transicional de vejiga.

El presente método comprende además una etapa de extracción de la muestra, ya sea para obtener el extracto de proteínas de ésta, o bien para obtener el extracto de RNA total. Uno de estos dos extractos representa el material de trabajo para la siguiente fase. Los protocolos de extracción de la proteína total o del RNA total son bien conocidos por el experto en la materia (Chomczynski P. et al., Anal. Biochem., 1987, 162: 156; Chomczynski P., Biotechniques, 1993, 15: 532; Molina, M.A., et al., Cancer Res., 1999, 59: 4356-4362).

Cualquier ensayo convencional se puede utilizar en el marco de la invención para detectar Carcinoma transicional de vejiga, siempre que mida *in vitro* los niveles de mRNA transcrito del gen *FGFR3* o su cDNA complementario, o la concentración de proteína FGFR3, en muestras recogidas de los individuos a analizar y de individuos control.

Así pues, esta invención proporciona un método para detectar la presencia de un carcinoma transicional de vejiga en un individuo, para determinar el estadio o la severidad de dicho carcinoma en el individuo, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dicho carcinoma basado, bien en la medida de la concentración de la proteína FGFR3, o bien en la medida del nivel de expresión del gen *FGFR3*.

En el caso de que lo que se pretenda detectar sea la proteína FGFR3, el método de la invención comprende una primera etapa de puesta en contacto del extracto de proteínas de la muestra con una composición de uno o más anticuerpos específicos contra uno o más epítomos de la proteína FGFR3, y una segunda etapa de cuantificación de los complejos formados por anticuerpos y la proteína FGFR3.

Existe una amplia variedad de ensayos inmunológicos disponibles para detectar y cuantificar la formación de complejos específicos antígeno-anticuerpo; numerosos ensayos de unión de proteínas, competitivos y no competitivos, han sido previamente descritos, y un gran número de estos ensayos está disponible comercialmente.

Así, la proteína FGFR3 se puede cuantificar con anticuerpos como, por ejemplo: anticuerpos monoclonales, policlonales, intactos o fragmentos recombinantes de ellos, combibodies y fragmentos Fab o scFv de anticuerpos, específicos contra la proteína FGFR3; siendo estos anticuerpos humanos, humanizados o de origen no humano. Existen anticuerpos que se unen específicamente a la proteína FGFR3, que están disponibles comercialmente. Los anticuerpos que se emplean en estos ensayos pueden estar marcados o no; los anticuerpos no marcados se pueden utilizar en ensayos de aglutinación; los anticuerpos marcados se pueden utilizar en una amplia variedad de ensayos. Las moléculas marcadoras que se pueden utilizar para marcar los anticuerpos incluyen radionucleótidos, enzimas, fluoróforos, reactivos quimioluminiscentes, sustratos enzimáticos o cofactores, inhibidores enzimáticos, partículas, colorantes y derivados.

Existe una amplia variedad de ensayos bien conocidos, que se pueden utilizar en la presente invención, que utilizan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y anticuerpos marcados (anticuerpo secundario); entre estas técnicas se incluyen el Western-blot o transferencia Western, ELISA (Enzyme-Linked immunosorbent assay o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), RIA (Radioimmunoassay o Radioinmunoensayo), EIA competitivo (Competitive enzyme immunoassay o Inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA (Double antibody sandwich-ELISA o ensayo ELISA sándwich con doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el empleo de biochips o microarrays de proteínas que incluyan anticuerpos específicos o ensayos basados en precipitación coloidal en formatos tales como *dipsticks*. Otras maneras para detectar y cuantificar la proteína FGFR3, incluyen técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando o ensayos de unión a lectina.

El inmunoensayo preferido en el método de la invención es un ensayo ELISA sándwich con doble anticuerpo. En este inmunoensayo se puede utilizar cualquier anticuerpo o combinación de anticuerpos, específicos contra uno o más epítopos de la proteína FGFR3. Como ejemplo de uno de los muchos posibles formatos de este ensayo, un anticuerpo, monoclonal o policlonal, o un fragmento de este anticuerpo, o una combinación de anticuerpos, que recubren una fase sólida, se ponen en contacto con la muestra a analizar, y se incuban durante un tiempo y en condiciones apropiados para formar los complejos antígeno-anticuerpo. Después de un lavado en condiciones apropiadas para eliminar los complejos no específicos, se incuban con los

complejos antígeno-anticuerpo, en condiciones y tiempo apropiados, un reactivo indicador, que comprende un anticuerpo monoclonal o policlonal, o un fragmento de este anticuerpo, o una combinación de estos anticuerpos, unidos a un compuesto generador de una señal. La presencia de la proteína FGFR3 en la muestra a analizar, se detecta y cuantifica, en caso de que exista, midiendo la señal generada. La cantidad de proteína FGFR3 presente en la muestra analizar es proporcional a esa señal.

En el caso de que se pretenda detectar el mRNA o el cDNA correspondiente al gen *FGFR3*, y no la proteína, el método para evaluar *in vitro* la susceptibilidad de un individuo a desarrollar el carcinoma transicional de vejiga de la invención posee etapas diferentes. Así, una vez obtenida la muestra y extraído el RNA total, el método de la invención, la detección del mRNA o del correspondiente cDNA del gen *FGFR3*, comprende una primera etapa de amplificación del extracto de RNA total o del correspondiente cDNA sintetizado por retrotranscripción a partir del mRNA, y una segunda etapa de cuantificación del producto de la amplificación del mRNA o del cDNA del gen *FGFR3*.

Un ejemplo de amplificación del mRNA, consiste en retrotranscribir el mRNA en cDNA (RT), seguido de la Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR), usando oligonucleótidos cebadores, siendo las secuencias de los cebadores utilizados 5'-GACGGTTTCCAGGGAGGGGC-3' y 5'-GTAACAGTACAGAA CGAACCAACTG-3'; la PCR es una técnica de amplificación de una determinada secuencia nucleotídica (diana) contenida en una mezcla de secuencias nucleotídicas. En la PCR, se utiliza un exceso de una pareja de oligonucleótidos cebadores, que hibridan con las hebras complementarias de la secuencia nucleotídica diana. A continuación, una enzima con actividad polimerasa (DNA Taq Polimerasa) extiende cada cebador, utilizando como molde la secuencia nucleotídica diana. Los productos de la extensión se convierten entonces en secuencias dianas, tras la disociación de la hebra diana original. Nuevas moléculas de cebador hibridan y la polimerasa las extiende; el ciclo se repite para aumentar exponencialmente el número de secuencias diana. Esta técnica está descrita en las patentes US 4683195 y US 4683202. Se han descrito previamente muchos métodos para detectar y cuantificar los productos de la amplificación por PCR, de los que cualquiera puede ser usado en esta invención. En un método

preferido de la invención, el producto amplificado se detecta por electroforesis en gel de agarosa, de la manera siguiente: cinco microlitros del producto de la amplificación se someten a una separación por electroforesis en un gel de agarosa a una concentración del 2%, en un tampón TBE 0,5x a 100 vdc, durante una hora. Tras la electroforesis, el gel se tiñe con bromuro de etidio y el producto de la amplificación se visualiza al iluminar el gel con luz ultravioleta (uv); como alternativa a la tinción, y realización preferida, se puede transferir el producto amplificado a una membrana de nailon por técnicas de *Southern blotting* o *transferencia Southern*, para ser detectado con una sonda específica del cDNA del gen *FGFR3*, convenientemente marcada.

En otro ejemplo la detección del mRNA se realiza transfiriendo el mRNA a una membrana de nailon, mediante técnicas de transferencia como por ejemplo Northern-blot o transferencia Northern, y detectándolo con sondas específicas del mRNA o del correspondiente cDNA del gen *FGFR3*.

En una realización particular la amplificación y cuantificación del mRNA correspondiente al gen *FGFR3* se realiza a la vez mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real (Q-PCR).

El paso final del método de para evaluar la susceptibilidad de un individuo de la invención comprende comparar la cantidad de proteína FGFR3, la del mRNA del gen *FGFR3* o la del correspondiente cDNA detectada en una muestra de un individuo, con la cantidad de proteína FGFR3, la del mRNA del gen *FGFR3* o la del correspondiente cDNA detectada en las muestras de sujetos control o en muestras anteriores del mismo individuo, o con los valores normales de referencia.

La invención también proporciona un método *in vitro* para identificar y evaluar la eficacia de agentes para terapia del Carcinoma transicional de vejiga, que comprende:

a) poner en contacto un cultivo de células tumorales (con proliferación descontrolada) de vejiga con el agente candidato, en las condiciones y durante el tiempo apropiados para permitir que interaccionen,

b) detectar y cuantificar los niveles de expresión del gen *FGFR3* o la proteína FGFR3, y

c) comparar dichos niveles de expresión con los de cultivos control de células tumorales.

5 La cuantificación de los niveles de expresión del gen *FGFR3* o la proteína *FGFR3* se realizan de modo semejante a como se indica en el método de la invención para detectar *in vitro* la presencia de un carcinoma transicional de vejiga en un individuo.

10 Cuando un agente disminuye los niveles de expresión del gen *FGFR3* o revierte los efectos de la expresión elevada de dicho gen, preferiblemente disminuyendo los niveles de proliferación celular, este agente se convierte en candidato para la terapia del carcinoma transicional de vejiga.

15 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de secuencias nucleotídicas o peptídicas derivadas del gen *FGFR3* para detectar la presencia de un carcinoma transicional de vejiga en un individuo, para determinar el estadio o la severidad de dicho carcinoma en el individuo, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dicho carcinoma.

20 En otro aspecto de la invención se hace referencia a agentes caracterizados porque inhiben la expresión y/o la actividad de la proteína *FGFR3*. Estos agentes, que se pueden identificar y evaluar según la presente invención, pueden ser seleccionados del grupo formado por:

25 a) un anticuerpo, o combinación de anticuerpos, específicos contra uno o más epítopos presentes en la proteína *FGFR3*, preferiblemente un anticuerpo monoclonal humano o humanizado; pudiendo ser también un fragmento del anticuerpo, un anticuerpo de cadena sencilla o un anticuerpo anti-idiotipo,

30 b) agentes citotóxicos, tales como toxinas, moléculas con átomos radiactivos, o agentes quimio-terapéuticos, entre los que se incluyen, sin limitación, pequeñas moléculas orgánicas e inorgánicas, péptidos, fosfopéptidos, moléculas antisentido, ribozimas, moléculas de triple hélice, etc., que inhiben la expresión y/o la actividad de la proteína *FGFR3*, y

c) compuestos antagonistas de la proteína *FGFR3*, que inhiben una o más de las funciones de la proteína *FGFR3*.

Por último, constituye también un objeto de la presente invención una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o varios agentes de los mencionados anteriormente junto con uno o más excipientes y/o sustancias transportadoras. Además dicha composición puede
5 contener cualquier otro ingrediente activo que inhiba la función de la proteína FGFR3.

Los excipientes, sustancias transportadoras y sustancias auxiliares tienen que ser farmacéuticamente y farmacológicamente tolerables, de modo que puedan ser combinados con otros componentes de la formulación o preparación y no ejerzan
10 efectos adversos en el organismo tratado. Las composiciones farmacéuticas o formulaciones incluyen aquellas que son adecuadas para la administración oral o parenteral (incluyendo subcutánea, intradérmica, intramuscular e intravenosa), aunque la mejor vía de administración depende del estado del paciente. Las formulaciones pueden ser en forma de dosis sencillas. Las formulaciones se preparan
15 de acuerdo con métodos conocidos en el campo de la farmacología. Las cantidades de sustancias activas para administrarse pueden variar en función de las particularidades de la terapia.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1.- Análisis diferencial de expresión del gen FGFR3 en muestras de tejido de vejiga, utilizando los microarrays *Human Genome U95 DNA arrays*.

1.1. Materiales y métodos

Microarrays. Se utilizaron los microarrays *GeneChip Test 3* (Affymetrix, Santa Clara), que permiten testar la calidad del RNA, previamente al análisis de expresión con el array *GeneChip Human Genome U95A* (Affymetrix, Santa Clara), que representa 12.000 secuencias completas de genes anotados; el gen FGFR3 está representado
25 en el microarray por el set de sondas 31805_at de Affymetrix, que son oligonucleótidos *sentido* de 25 nucleótidos de longitud, diseñados en base a la secuencia Hs.1420 de Unigene, o M64347 de GeneBank (Tabla 1).

Tabla 1. Descripción de las sondas correspondientes al set de sondas 31805_at.

Orden Consecutivo De las sondas	Zona de la secuencia de referencia interrogada	Secuencia de la sonda (5'3')	Posición de la sonda en la secuencia de mRNA del gen
1	3511	TCCAAGCCTAAAAGGTTGTTAATAG	3227
2	3625	ATTTTTTGGACTTCAAAGCAAGCTG	3340
3	3633	GACTTCAAAGCAAGCTGGTATTTTC	3348
4	3663	AATTCTTCTAATTGCTGTGTGTCCC	3378
5	3684	TCCCAGGCAGGGAGACGGTTTCCAG	3399
6	3716	CCGGCCCTGTGTGCAGGTTCCGATG	3431
7	3722	CTGTGTGCAGGTTCCGATGTTATTA	3437
8	3821	CACCTCTTACGCAATGCTTCTAGAG	3536
9	3825	TCTTACGCAATGCTTCTAGAGTTT	3540
10	3831	GCAATGCTTCTAGAGTTTATAGCC	3546
11	3861	TGCTACCTTTCAAAGCTTGGAGGGA	3576
12	3873	AAGCTTGGAGGGAAGCCGTGAATTC	3588
13	3891	TGAATTCAGTTGGTTCGTTCTGTAC	3606
14	3903	GTTCTGTTCTGTACTGTTACTGGGCC	3618
15	3933	TCTGGGCAGCTGTCCCTTGCTTGCC	3648
16	4005	GTGGCCAGAGGTGTACCCAAACCG	3720

5

Muestras. Las muestras estudiadas procedían de biopsias, obtenidas por resección quirúrgica transuretral, de sujetos control sin Carcinoma transicional de vejiga ($n = 7$), y de biopsias de pacientes que fueron clínicamente tipados tras resección y que presentaban Carcinoma transicional de vejiga ($n = 22$) en uno de los siguientes estadios: Tumores de bajo grado que respetan la lámina propia (Ta G1), tumores de alto grado que infiltran la lámina propia (T1 G3) y tumores de alto grado que invaden tejido muscular (T2 G3). Todas las muestras fueron clasificadas histológicamente (grado y estadio) en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, el mismo hospital donde las muestras habían sido recogidas, siguiendo los preceptos de la Declaración de Helsinki. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido inmediatamente tras su extracción y se mantuvieron a -80°C hasta el momento de su análisis.

De cada tipo de tumor así como de las muestras sanas se recibieron varios casos:

- Control de tejido sano (mucosa sin estrato muscular): 5 muestras
- Control de tejido sano (mucosa con estrato muscular): 2 muestras

20

- Bajo grado respeta lámina propia (TaG1): 9 muestras
- Alto grado infiltra lámina propia (T1G3): 7 muestras
- Alto grado invade músculo (T2G3): 6 muestras

5 **Análisis *GeneChip* de expresión génica**

El análisis se llevó a cabo con RNA total procedente de sujetos individuales, y con mezclas equimolares (*pools*) de RNAs totales procedentes de distintos sujetos sanos, o afectados de Carcinoma transicional de vejiga del mismo estadio (Tabla 2).

10 **Tabla 2. Descripción y número de muestras analizadas**

	Control epitelial	Control muscular	Ta G1	T1 G3	T2 G3
Muestras	3*(pC1) ^a , 2 (pC3)	2 (pC2)	1,4(pTa.1) ^b , 4 (pTa.2)	1,2(pT1.1) ^c , 4 (pT1.2)	1, 2(pT2.1) ^d , 3 (pT2.2)

* número de muestras que forman parte de cada *pool*.

^a pC: *pool* de muestras control. Ejemplo: 3(pC1) = *pool* 1 de 3 muestras control.

^b pTa: *pool* de muestras de tumores de bajo grado (G1) que respetan la lámina propia (Ta).

Ejemplo: 4(pTa.1) = *pool* 1 de 4 muestras TaG1.

^c pT1: *pool* de muestras de tumores de alto grado (G3) que infiltran la lámina propia (T1).

Ejemplo: 2(pT1.1) = *pool* 1 de 2 muestras T1G3.

^d pT2: *pool* de muestras de tumores de alto grado (G3) que invaden tejido muscular (T2).

Ejemplo: 2(pT2.1) = *pool* 1 de 2 muestras T2G3.

25 **Síntesis del cRNA**

El RNA total de cada una de las biopsias se obtuvo homogenizando el tejido en TRIzol® Reagent (Life Technologies), siguiendo las recomendaciones del proveedor. El RNA total resultante se limpió con el kit Rneasy (QIAGEN) (Chomczynski P. et al., Anal. Biochem., 1987, 162: 156; Chomczynski P., Biotechniques, 1993, 15: 532). De cada preparación de RNA total se usaron 10 µg como material de partida para la síntesis de la primera hebra de cDNA con la enzima transcriptasa inversa SuperScript™ II RNase (Life Technologies), usando como cebador un oligonucleótido oligo-dT que contenía la secuencia del promotor de la RNA polimerasa del fago T7. La segunda hebra de cDNA se sintetizó utilizando los enzimas DNA polimerasa I de *E. coli* (Invitrogen Life Technologies), DNA ligasa de *E. coli* (Invitrogen Life Technologies), Rnasa H de *E. coli* (Invitrogen Life Technologies), y

DNA polimerasa del fago T4 (Invitrogen Life Technologies). El cRNA marcado con biotina se sintetizó usando el kit ENZO BioArray™ HighYield™ Transcript Labeling Kit (Enzo Diagnostics Inc). Después de la transcripción *in vitro*, se eliminaron los nucleótidos no incorporados usando las columnas Rneasy (QIAGEN).

5

Hibridación y escaneado del array

Se fragmentaron 15 µg de cada cRNA biotinilado a 94°C durante 35 minutos en una solución tampón que contenía 40 mM Tris-Acetato (pH 8.1), 100mM KOAc y 30mM MgOAc. El cRNA fragmentado se mezcló con buffer de hibridación (100mM MES, 1M NaCl, 20 mM EDTA, 0.01% Tween 20) y se calentó a 99° durante 5 minutos y posteriormente a 45° durante 5 minutos, para a continuación ser cargado en el array de Affymetrix. El primer array en el que se realizó la hibridación fue el Test 3 de Affymetrix. Este array permite testar la calidad del RNA previo al análisis de expresión en el Affymetrix® GeneChip® *Human Genome* 95 A (HG-U95A).

15 Para la hibridación, los arrays se incubaron en un horno rotatorio a 45° durante 16 horas y con una rotación constante de 60 rpm.

El lavado y tinción de cada array se llevó a cabo en la Estación de Fluidos de Affymetrix®. Se usó un programa de lavado y tinción que incluía:

20 -10x2 ciclos de lavado con SSPE-T 6x (0.9 M NaCl, 60 mM NaH₂PO₄, 6 mM EDTA, 0.01% Tween 20) a 25°,

-4x15 ciclos con 0.1 mM MES, 0.1M NaCl, 0.01% Tween 20 a 50° ,

-Tinción del cRNA biotinilado con un conjugado estreptavidina-ficoeritrina (10 µg/ml Molecular Probes)

-10x4 ciclos de lavado con SSPE-T a 25°

25 -Tinción con un anticuerpo anti-estreptavidina durante 10 minutos

-Tinción un conjugado estreptavidina-ficoeritrina (1 mg/ml, Molecular Probes) durante 10 minutos

-15x4 ciclos de lavado con SSPE-T a 30°

30 Los arrays se escanearon a 560 nm usando un microscopio confocal que utiliza emisión láser (Agilent GeneArray Scanner). El análisis de las lecturas de intensidad se realizó con el software Microarray Suite 5.0. Para la comparación de arrays, éstos fueron escalados a una intensidad total de 100.

1.2. Resultados.

El análisis diferencial de la expresión del gen FGFR3 en los estadios tumorales con respecto al control, se realizó a partir de los datos de comparación de arrays obtenidos utilizando el software de Affymetrix. Los parámetros que se tuvieron en cuenta (en el orden en el que aparecen en la lista) fueron: i) Detección: Indica si el transcrito está Presente (P), Ausente (A) o Marginal (M), ii) Cambio: Indica si la expresión de un determinado transcrito Aumenta (I), Decrece (D), No Cambia (NC), Aumenta Marginalmente (MI), o Decrece Marginalmente (MD), iii) Signal Log Ratio (SLR): Indica el nivel de cambio de expresión entre la línea base (control) y una muestra problema. Este cambio se expresa como el \log_2 del ratio (*fold change* o número de veces que la expresión del gen está elevada o reprimida en la muestra problema-tumoral frente a la muestra control-sana). Se considera significativo un valor de SLR de 1 (equivalente a un *fold change* de 2), para transcritos cuya expresión aumenta frente al control) y de -1, para transcritos cuya expresión disminuye frente al control.

Tabla 3. Resultados obtenidos para Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3). N. Acc. M64347

Señal de la muestra control	Detección en muestra control	Detección en estadio Ta G1	SLRTa G1vs Control	Cambio en estadio TaG1	Comparación
132.7	P	P	2.5	I	pTa.1 vs pC1
67.7	A	P	4.2	I	pTa.1 vs pC2
28.1	A	P	4.4	I	pTa.1 vs pC3
132.7	P	P	1	I	pTa.2 vs pC1
67.7	A	P	3	I	pTa.2 vs pC2
28.1	A	P	3.5	I	pTa.2 vs pC3
PROMEDIO SLR			3.1		
Señal de la muestra control	Detección en muestra control	Detección en estadio T1 G3	SLR T1G3 vs Control	Cambio en estadio T1G3	Comparación
132.7	P	P	1.7	I	pT1.1 vs pC1
67.7	A	P	3.9	I	pT1.1 vs pC2
28.1	A	P	3.7	I	pT1.1 vs pC3
132.7	P	P	2	I	pT1.2 vs pC1

67.7	A	P	4.1	I	pT1.2 vs pC2
28.1	A	P	4.4	I	pT1.2 vs pC3
PROMEDIO SLR			3.3		
Señal de la muestra control	Detección en muestra control	Detección en estadio T2 G3	SLR T2G3 vs Control	Cambio en estadio T2G3	Comparación
132.7	P	P	1.4	I	pT2.1vspC1
67.7	A	P	3.3	I	pT2.1vspC2
28.1	A	P	3.2	I	pT2.1vspC3
132.7	P	P	0.6	I	pT2.2vspC1
67.7	A	P	2.4	I	pT2.2vspC2
28.1	A	P	2.7	I	pT2.2vspC3
PROMEDIO SLR			2.26		

1.3. Discusión

El análisis diferencial de la expresión del gen FGFR3 en los estadios tumorales con respecto al control, demuestra que los niveles de expresión del gen FGFR3 estaban elevados más de 8 veces (SLR>3) en biopsias de tumores de vejiga de bajo grado TaG1 o de grado alto invade lámina propia T1 G3, frente a los controles, mientras que el incremento de expresión era mayor de 4 veces (SLR>2) en tumores de alto grado que invaden músculo (T2G3).

Ejemplo 2.- Análisis diferencial de expresión de la proteína FGFR3 en muestras de tejido de vejiga, utilizando la técnica western-blot con anticuerpos específicos.

2.1. Materiales y métodos.

Muestras: Se analizaron muestras de biopsia de vejiga procedentes de 3 individuos sanos (muestras número 46, 55 y 63), seis muestras de carcinoma transicional de vejiga de bajo grado, superficial (TaG1) (muestras número 48, 49, 50, 53, 56 y 59), tres muestras de carcinoma transicional de vejiga de alto grado, invade lámina propia

(T1G3) (muestras número 57, 61, 67), cuatro muestras de alto grado, invade músculo (T2 G3) (muestras número 47, 51, 58, 60) y dos muestras de grado desconocido (muestras número 54, 62). Las muestras procedían de sujetos distintos a los analizados con microarrays de DNA. Los tejidos se conservaron a -80°C desde el momento de su obtención hasta su utilización para la extracción de proteínas. Todos los tejidos empleados en este estudio fueron muestras obtenidas por resección quirúrgica transuretral en el Servicio de Urología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander, España); las muestras se tiparon histológicamente en el servicio de Anatomía Patológica del mismo hospital. Durante todo el proceso se cumplieron los preceptos estipulados en la Declaración de Helsinki.

Obtención de extractos proteicos: Las muestras congeladas de tejidos se homogeneizaron en morteros con N₂ líquido y al producto pulverizado se le añadió tampón RIPA B [fosfato sódico 20 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, Tritón X-100 1%, EDTA 5 mM y un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics Inc., Mannheim, RFA)].

Ensayos de transferencia de Western: Se tomaron muestras de los extractos proteicos con 20 µg de proteína total, se les añadió tampón de carga de SDS-PAGE con un 5% de β-mercaptoetanol y se incubaron a 100°C durante 5 min para luego cargarlas en un gel al 6% de poliacrilamida. Las proteínas se transfirieron luego a membranas de nitrocelulosa para revelarlas con anticuerpos monoclonales dirigidos contra el dominio extracelular de la proteína FGFR3 (Santa Cruz Biotech. Inc., Santa Cruz, CA, EE.UU.). Finalmente, las membranas se hibridaron con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (Amersham, Little Chalfont, RU) y se detectó la señal quimoluminiscente con el sistema ECL (Amersham). Las películas de revelado empleadas fueron también de Amersham. Como control de carga, membranas a las que se transfirieron las proteínas de geles replicados con un anticuerpo anti-actina (Amersham).

2.2. Resultados.

Expresión de la proteína FGFR3 en carcinomas transicionales de vejiga: La expresión de FGFR3 en muestras normales (n = 3) y tumorales (n = 15) se examinó

por transferencia de Western. Los resultados obtenidos se recogen en la Fig. 1 y en la tabla 4. Como se puede observar, la proteína FGFR3 no era detectable en ninguna de las muestras de tejido sano. En cuanto a las muestras tumorales, estaba presente en 11 de las 15 analizadas (73%), siendo mayor este porcentaje en los tumores de bajo grado (83%) y en los tumores de alto grado que infiltran la lámina propia (100%). El receptor aparecía en forma de varias bandas inmunorreactivas de distinto peso molecular: 135 kDa, que corresponde al receptor totalmente glucosilado; 85 kDa, que corresponde a la forma intracelular no glucosilada, y bandas de masa molecular intermedia (100-110 kDa), que corresponden a distintos grados de glucosilación de FGFR3. Además, se detectaban bandas inmunorreactivas de peso molecular menor (50 kDa), procedentes probablemente de su degradación proteolítica (Figura 1).

Tabla 4: Expresión de FGFR-3 en carcinomas transicionales de vejiga

Tipo de muestra	<i>n</i>	Muestras pos para FGFR-3	% de muestras positivas
Vejiga normal	3	0	0
Carcinoma TaG1	6	5	83
Carcinoma T1G3	3	3	100
Carcinoma T2G3	4	2	50
Carcinoma grado desconocido	2	1	50

2.3. Discusión.

Los resultados que se presentan en este trabajo demuestran que la proteína FGFR3, ausente en vejiga normal, se expresa en una mayoría de carcinomas transicionales de vejiga. En algunos de dichos tumores los niveles de FGFR3 son singularmente elevados. La sensibilidad del sistema de detección es del 73% y la especificidad del 100%.

Ejemplo 3. Inhibición de la proliferación celular en líneas celulares tumorales de vejiga, tratadas con anticuerpos específicos contra la proteína FGFR3.

3.1. Materiales y métodos.

Líneas celulares en cultivo: La línea de carcinoma transicional de vejiga usada en este estudio fue RT-112 (Marshall, C.J., et al, J. Natl. Cancer Inst., 1977, 58:1743), derivada de un tumor primario; que se obtuvo de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (Braunschweig, RFA). La línea RT-112 se
5 creció en medio RPMI, suplementado con 10% FBS y 2 mM de glutamina, excepto en los casos en que se indica lo contrario. Todos los reactivos para cultivo celular (medios, suero, etc.) se adquirieron de Invitrogen (Paisley, RU).

Obtención de extractos proteicos: Las células de una placa de 10 cm se lavaron
10 dos veces con PBS frío y se recogieron en 0,5 mL de RIPA B. Las muestras se centrifugaron entonces a 15000 xg durante 10 min a 4°C para eliminar los restos celulares, se recuperó el sobrenadante y se estimó la concentración de proteínas mediante el ensayo de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.) (Molina, M. A. et al., Cancer Res., 1999, 59: 4356-4362).

Ensayos de transferencia de Western: Se tomaron muestras de los extractos
15 proteicos con 20 µg de proteína total, se les añadió tampón de carga de SDS-PAGE con un 5% de β-mercaptoetanol y se incubaron a 100°C durante 5 min para luego cargarlas en un gel de poliacrilamida al 6%. A continuación, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para revelarlas con anticuerpos
20 monoclonales dirigidos contra el dominio extracelular de FGFR3 (Santa Cruz Biotech. Inc., Santa Cruz, CA, EE.UU.). Finalmente, las membranas se hibridaron con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (Amersham, Little Chalfont, RU) y se detectó la señal quimioluminiscente con el sistema ECL (Amersham). Las películas
25 de revelado empleadas fueron también de Amersham. Como control de la cantidad de proteína cargada, se hibridaron membranas a las que se transfirieron las proteínas de geles replicados con un anticuerpo anti-actina (Amersham).

Ensayos de proliferación celular: Los efectos de anticuerpos monoclonales de
30 ratón contra FGFR3 y la β2-microglobulina (Santa Cruz) en el crecimiento celular, se determinaron mediante ensayos de proliferación. Los anticuerpos se concentraron y lavaron tres veces con PBS empleando un filtro Amicon de 10 kDa (Millipore CO., Bedford, MA), para así eliminar la azida sódica con la que se suministran. A continuación, se esterilizaron pasándolos a través de un filtro de 0,22 µm previamente

saturado con DMEM + 10% FBS y se diluyeron en medio de cultivo. Las células RT-112 se sembraron a una densidad de 2000 células por pocillo en placas de cultivo de 96 pocillos en medio RPMI + 10% FBS. Se dejó que las células se adhiriesen durante 24 horas y posteriormente se retiró el medio para sustituirlo por RPMI fresco con concentraciones de anticuerpo entre 0 y 20 mg/mL. Después de una incubación de 1 ó 2 días, se estimó el número de células mediante el ensayo MTT (metiltiazoltetrazolio) (Sigma Chemical Co., St Louis, EE.UU.) según se describe a continuación. Se preparó una disolución de metiltiazoltetrazolio (MTT) 1 mg/mL en medio de cultivo con suero. Después de la incubación de 1 ó 2 días, se retiró el medio de los pocillos y se añadieron 100 µl del medio con MTT. Algunos pocillos sin células se usaron como blancos. La placa se incubó a 37° entre 30 minutos y una hora. Después de este tiempo se forma un precipitado violáceo en el interior de las células a menudo visible. A continuación se retiró el medio y añadieron 100 µl de DMSO no estéril por pocillo. Se determinó la absorbancia de los pocillos a 550 nm y la cantidad de células de cada pocillo se extrapoló usando una recta patrón.

3.2. Resultados.

Expresión de la proteína FGFR-3 en la línea celular de carcinoma transicional de vejiga RT-112. La expresión de FGFR-3 se estudió mediante transferencia de Western, detectándose elevados niveles del receptor (Fig. 2). Este aparecía en forma de varias bandas inmunorreactivas de distinto peso molecular: 135 kDa, que corresponde al receptor totalmente glucosilado; 85 kDa, que corresponde a la forma intracelular no glucosilada, y bandas de masa molecular intermedia (100-110 kDa), que corresponden a distintos grados de glucosilación de FGFR3. Además, se detectaban bandas inmunorreactivas de peso molecular menor (50 kDa), procedentes probablemente de su degradación proteolítica.

Inhibición del crecimiento celular por anticuerpos anti-FGFR3: Durante los últimos años, se han descrito diversos anticuerpos dirigidos contra dominios extracelulares de receptores de membrana con propiedades antiproliferativas. Por esta razón, se decidió ensayar si los anticuerpos monoclonales anti-FGFR3 eran capaces de inhibir el crecimiento de células de carcinoma transicional de vejiga en cultivo. Para los ensayos, se eligió la línea RT-112, la única que expresaba niveles

detectables de receptor. Los ensayos se llevaron a cabo en medio libre de suero o con un 10% de FBS, y las células se incubaron en presencia del anticuerpo 24 y 48 h. Como control, se usaron anticuerpos anti- $\beta 2$ microglobulina, también monoclonales de ratón y suministrados por la misma casa comercial (Santa Cruz) a la misma concentración que los anti-FGFR3. Se comprobó que la azida con la que se suministran dichos anticuerpos resultaba tóxica para las células RT-112, por lo que se procedió a su eliminación mediante concentraciones sucesivas con filtros del tipo Amicon de 10 kDa. Así para los ensayos de proliferación se emplearon únicamente anticuerpos de los que se había eliminado la azida. Además, previamente se ensayó mediante transferencia de Western que no habían perdido actividad durante el proceso de concentración y filtración. Tal y como se puede observar en la Fig 3, los anticuerpos anti-FGFR3 inhibían la proliferación de células RT-112 creciendo en medio libre de suero después de 2 días de tratamiento, mientras que los anticuerpos anti- $\beta 2$ microglobulina no tenían ningún efecto. En cambio, si los ensayos se llevaban a cabo en medio con un 10% de FBS, ningún anticuerpo tenía efectos significativos sobre la proliferación de las células RT-112.

3.3. Discusión.

Los resultados que se presentan en este ejemplo demuestran que los niveles de expresión de la proteína FGFR3, ausente en vejiga normal, son elevados en la línea de carcinoma transicional humano RT-112. FGFR3 es una glucoproteína de membrana que se une a factores de crecimiento de la familia del FGF, lo que inicia una cascada de señales intracelulares que estimula la proliferación celular (Keegan et al., Oncogene, 1991, 6:2229-2236). Dicho receptor podría pues tener un papel en la génesis y progresión del carcinoma transicional de vejiga.

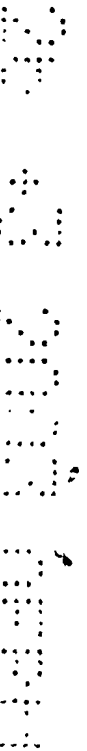
El tratamiento de células RT-112 con anticuerpos monoclonales dirigidos contra el dominio extracelular del FGFR3 inhibe su crecimiento en ausencia de suero. Varios mecanismos, no excluyentes entre sí, podrían explicar este efecto: el anticuerpo podría bloquear el lugar de unión para el factor de crecimiento o impedir la dimerización del receptor (previa a su activación) o provocar la depleción del mismo de la membrana plasmática.

En resumen, la sobreexpresión de FGFR3 en carcinoma transicional de vejiga humano y el hecho de que anticuerpos contra el mismo inhiban la proliferación de células en cultivo de carcinoma transicional, lo hace un buen candidato a diana

terapéutica para desarrollar fármacos contra el carcinoma transicional de vejiga; estos mismos resultados demuestran que el principio activo de uno de esos fármacos podría ser un anticuerpo específico contra FGFR3.

5

10



REIVINDICACIONES

5 1. Método *in vitro* para detectar la presencia de un carcinoma transicional de vejiga en un individuo, para determinar el estadio o la severidad de dicho carcinoma en el individuo, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dicho carcinoma, que comprende:

a) la detección y/o cuantificación de la proteína FGFR3, del mRNA del gen FGFR3 o el correspondiente cDNA en una muestra de dicho individuo, y

10 b) la comparación de la cantidad de proteína FGFR3, de la cantidad de mRNA del gen *FGFR3* o de la cantidad del correspondiente cDNA detectada en una muestra de un individuo, con la cantidad de proteína FGFR3, con la cantidad del mRNA del gen *FGFR3* o con la cantidad del correspondiente cDNA detectada en las muestras de individuos control o en muestras anteriores del mismo individuo o con los valores normales de referencia.

15

2. Método según la reivindicación 1 en el que dicha muestra es una muestra de tejido de vejiga.

20

3. Método según la reivindicación 2 en el que dicha muestra de tejido de vejiga a analizar se obtiene por cualquier método convencional, preferiblemente cistoscopia.

25

4. Método según la reivindicación 1 en el que dicha muestra es una muestra de orina, sangre, plasma, suero, líquido pleural, líquido ascítico, líquido sinovial, bilis, semen o líquido cefalorraquídeo.

5. Método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra a analizar se obtiene de un individuo al que no se le ha diagnosticado previamente carcinoma transicional de vejiga.

30

6. Método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra a analizar se obtiene de un individuo al que se le ha diagnosticado previamente carcinoma transicional de vejiga.

7. Método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra a analizar se obtiene de un individuo en tratamiento, o que ha sido tratado previamente, contra carcinoma transicional de vejiga.

5 8. Método según la reivindicación 1 caracterizado porque comprende la realización de una extracción de la muestra, bien para obtener un extracto de proteínas o bien para obtener un extracto que consiste en el RNA total.

10 9. Método según la reivindicación 8 caracterizado porque la detección de la proteína FGFR3 comprende una primera etapa de puesta en contacto del extracto de proteínas de la muestra con una composición de uno o más anticuerpos específicos contra uno o más epítomos de la proteína FGFR3, y una segunda etapa de cuantificación de los complejos formados por los anticuerpos y la proteína FGFR3.

15 10. Método según la reivindicación 9 caracterizado porque dichos anticuerpos comprenden anticuerpos monoclonales, policlonales, intactos o fragmentos recombinantes de ellos, combibodies y fragmentos Fab o scFv de anticuerpos, específicos contra la proteína FGFR3; siendo estos anticuerpos humanos, humanizados o de origen no humano.

20 11. Método según las reivindicaciones 9 ó 10 caracterizado porque para la cuantificación de los complejos formados por los anticuerpos y la proteína FGFR3 se utilizan técnicas seleccionadas del grupo formado por: Western-blot, ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay o ensayo de inmunosorbente ligado a enzima), RIA (Radioinmunoassay o Radioinmunoensayo), EIA Competitivo (Competitive Enzyme Immunoassay o Inmunoensayo Enzimático Competitivo), DAS-ELISA (Double antibody Sandwich-ELISA o ensayo ELISA Sándwich con Doble Anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el empleo de biochips o microarrays de proteínas que incluyan anticuerpos específicos, ensayos basados en precipitación con oro coloidal en formatos tales como *dipsticks*; o mediante técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando o ensayos de unión a lectina.

25

30

12. Método según la reivindicación 8 caracterizado porque la detección del mRNA o del correspondiente cDNA del gen *FGFR3* comprende una primera etapa de amplificación del mRNA, incluido en el extracto de RNA total, o del correspondiente cDNA sintetizado por retrotranscripción del mRNA, incluido en el extracto de RNA total, y una segunda etapa de cuantificación del producto de la amplificación del mRNA o del cDNA del gen *FGFR3*.

13. Método según la reivindicación 12 caracterizado porque la amplificación se realiza de manera cualitativa o cuantitativa, mediante RT-PCR usando oligonucleótidos cebadores, siendo las secuencias de los cebadores utilizados 5'-GACGGTTTCCAGGGAGGGGC-3' y 5'-GTAACAGTACAGAA CGAACCAACTG-3'.

14. Método según la reivindicación 8 caracterizado porque la detección se realiza con sondas específicas del mRNA o del correspondiente cDNA del gen *FGFR3*, mediante técnicas como por ejemplo Northern-blot o transferencia Northern.

15. Método según las reivindicaciones 8 caracterizado porque la detección del mRNA se efectúa mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real (Q-PCR).

16. Uso de secuencias nucleotídicas o peptídicas derivadas del gen *FGFR3* para detectar *in vitro* la presencia de un carcinoma transicional de vejiga en un individuo, para determinar *in vitro* el estadio o la severidad de dicho carcinoma en el individuo, o para monitorizar *in vitro* el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dicho carcinoma.

17. Método *in vitro* para identificar y evaluar la eficacia de compuestos para terapia del Carcinoma transicional de vejiga, que comprende:

a) poner en contacto un cultivo de células tumorales (con proliferación descontrolada) de vejiga con el compuesto candidato, en las condiciones y durante el tiempo apropiados para permitir que interaccionen,

b) detectar y cuantificar los niveles de expresión del gen *FGFR3* o la proteína *FGFR3*, y

c) comparar dichos niveles de expresión con los de cultivos control de células tumorales sin tratar con el compuesto candidato.

18. Uso de secuencias nucleotídicas o peptídicas derivadas del gen *FGFR3*, en métodos de búsqueda, identificación, desarrollo y evaluación de la eficacia de compuestos para terapia del Carcinoma transicional de vejiga.

5 19. Agentes caracterizados porque inhiben la expresión y/o la actividad de la proteína FGFR3.

20. Agentes según la reivindicación 19 seleccionados del grupo formado por:

10 a) un anticuerpo, o combinación de anticuerpos, específicos contra uno o más epítomos presentes en la proteína FGFR3, preferiblemente un anticuerpo monoclonal humano o humanizado; pudiendo ser también un fragmento del anticuerpo, un anticuerpo de cadena sencilla o un anticuerpo anti-idiotipo,

15 b) agentes citotóxicos, tales como toxinas, moléculas con átomos radiactivos, o agentes quimio-terapéuticos, entre los que se incluyen, sin limitación, pequeñas moléculas orgánicas e inorgánicas, péptidos, fosfopéptidos, moléculas antisentido, ribozimas, moléculas de triple hélice, RNA de doble hebra, etc., que inhiben la expresión y/o la actividad de la proteína FGFR3, y

20 c) compuestos antagonistas de la proteína FGFR3, que inhiben una o más de las funciones de la proteína FGFR3.

21. Agentes según las reivindicaciones 19 ó 20 para el tratamiento del carcinoma transicional de vejiga.

25 22. Uso de los agentes según las reivindicaciones 19 ó 20 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del carcinoma transicional de vejiga.

30 23. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o varios agentes según las reivindicaciones 19 ó 20 junto con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

24. Composición farmacéutica según la reivindicación 23 caracterizada porque contiene otro ingrediente activo, preferiblemente uno que inhiba la función de la proteína FGFR3.

FIGURA 1

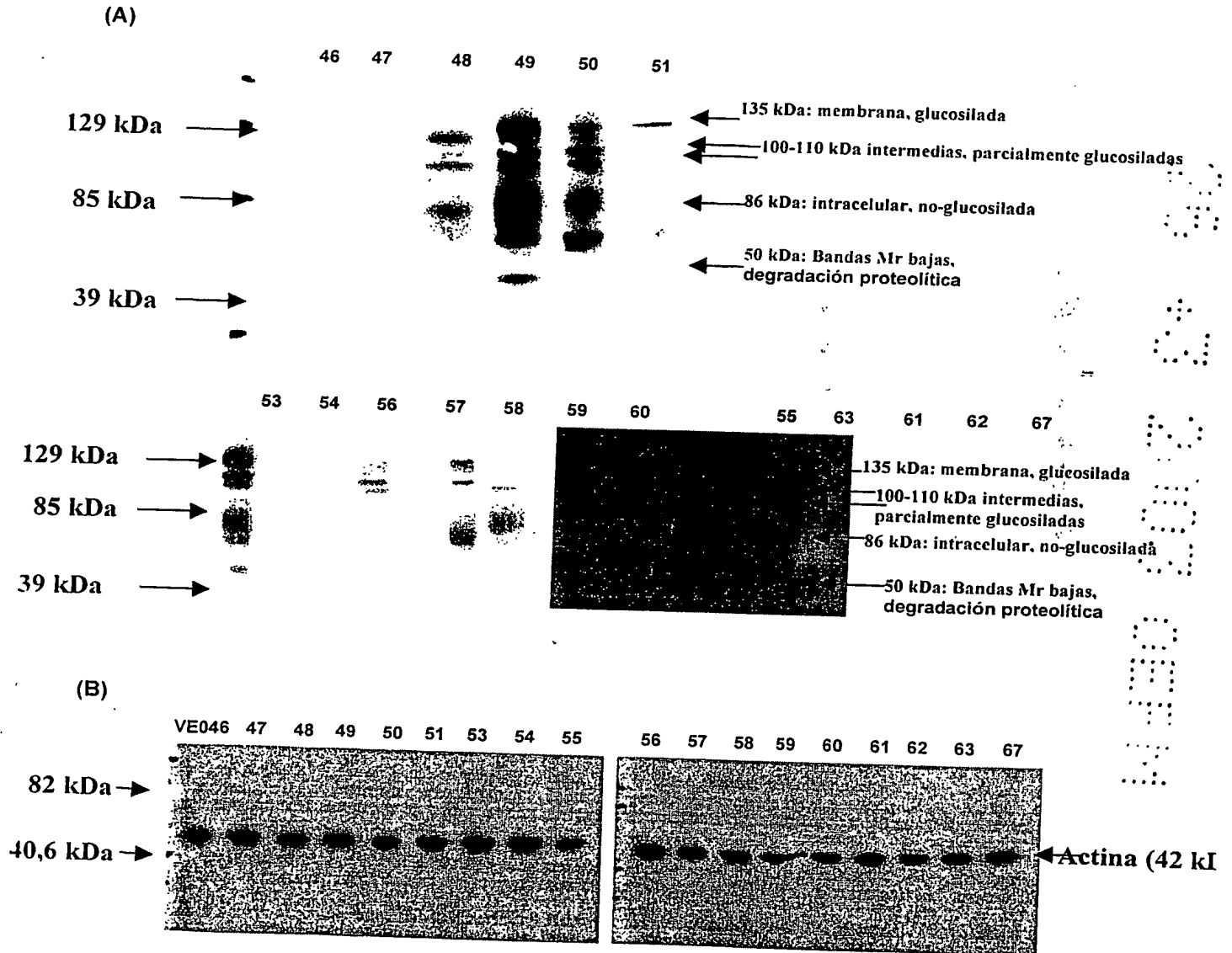


FIGURA 2

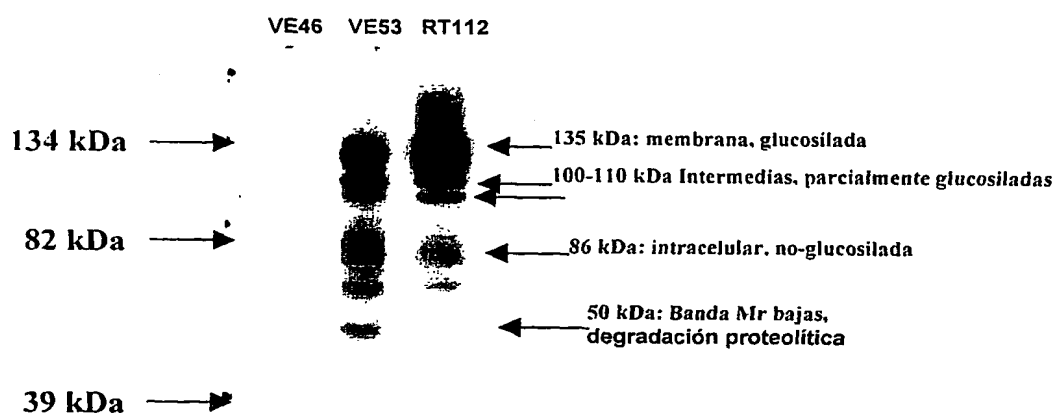
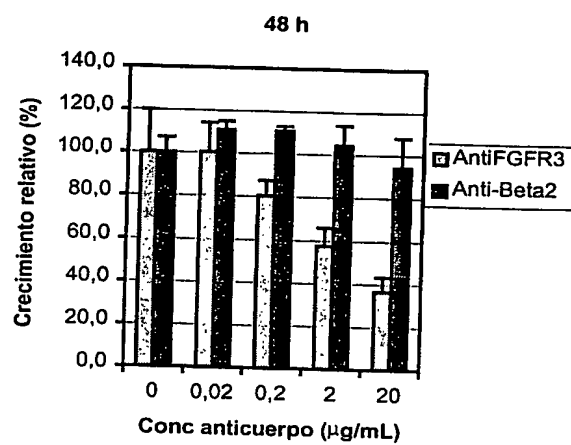
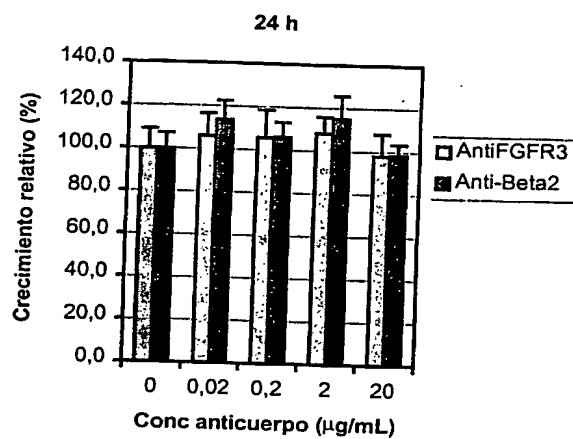


FIGURA 3



PCT/EP2004/003219



This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**